

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

09/914220
REC'D 25 APR 2000

WIPO PCT

Bescheinigung

DE 00 / 506

4

Herr Dr. Burkhard S c h u l z in Köln/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

„DNA Sequenz kodierend ein FKBP ähnliches Protein, Plasmide, Bakterien, Hefen und Pflanzen enthaltend dieses Protein sowie Mutanten in Arabidopsis für dieses Gen, die in der Ausprägung der Pflanzenarchitektur, der Reaktion gegenüber Brassinosteroiden und ihren Verbindungen und durch Ethylen vermittelten Gravitropismus der Wurzel defekt sind“

am 22. Februar 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole C 07 H, C 12 N und A 01 M der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

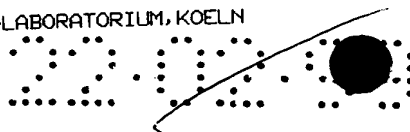
München, den 11. April 2000

Deutsches Patent- und Markenamt
Agurke

Der Präsident

Im Auftrag

Aktenzeichen: 199 07 598.0



DNA Sequenz kodierend ein FKBP ähnliches Protein, Plasmide, Bakterien, Hefen und Pflanzen enthaltend dieses Protein sowie Mutanten in Arabidopsis für dieses Gen, die in der Ausprägung der Pflanzenarchitektur, der Reaktion gegenüber Brassinosteroiden und ihren Verbindungen und durch Ethylen vermittelten Gravitropismus der Wurzel defekt sind

Die vorliegende Erfindung betrifft DNA-Sequenzen aus *Arabidopsis thaliana*, die die Kodierregion eines FKBP-ähnlichen (FK506 bindendes Protein) Gens (twisted dwarf) enthält, deren Aktivität in einem pflanzlichen Genom die Veränderung der Gesamtarchitektur der Pflanze durch Verringerung des Zellwachstums, Desorientierung des Wachstums aller überirdischen wie unterirdischen Organe, Verringerung des Verzweigungsgrads des Sproßes, Veränderungen in der Reaktion auf Brassinosteroide und deren Vorstufen und Derivate und die Veränderung der Reaktion der Wurzel auf gravitrope Reize durch die Veränderung von Ethylenproduktion und Ethylen induzierte Signalweiterleitung zur Folge hat, Plasmide, Hefen und Bakterien enthaltend diese DNA-Sequenz, sowie Mutanten in *Arabidopsis thaliana*, in denen die twisted dwarf DNA-Sequenz entweder durch T-DNA Insertion oder durch Deletion oder Insertion verschieden großer DNA-Bereiche verändert wurde und die erwähnten Veränderungen aufweisen. Des weiteren betrifft die Erfindung transgene Pflanzen, bei denen mutierte DNA-Sequenzen der angegebenen Gensequenz durch Einführung intakter Genkopien phänotypisch zum Wildtyp restauriert wurden. Weiterhin betrifft die Erfindung die Nutzung der beschriebenen Gensequenz des twisted dwarf-Gens zur Identifizierung verwandter FKBP ähnlicher Gene aus anderen dikotylen und monokotylen Pflanzen durch Hybridisierung mit niedriger Stringenz oder durch PCR Techniken, sowie die Nutzung des twisted dwarf Gens und seiner Mutanten als pflanzliches Testsystem zum Studium von immunsuppressiven Substanzen (besonders FK506 (Tacrolimus), Rapamycin, CyclosporinA und weiterer Substanzen mit ähnlicher Wirkung), ihrer Wirkung, sowie Prozessen der Signalvermittlung der Wirkung von Immunsuppressiva.

Die sessile Lebensweise von Pflanzen fordert eine hohe Anpassungsfähigkeit an die Umweltbedingungen des Standortes. Die endogenen Wachstums- und Entwicklungsprogramme müssen auf exogene Faktoren abgestimmt werden. Dies setzt die Perzeption von exogenen Faktoren voraus, die für die Pflanze lebenswichtig sind. Da der Perzeptionsort meist vom Ort der Reizantwort verschieden ist, muß eine inter- und intrazelluläre Signaltransduktion stattfinden. Obwohl in Pflanzen und Tieren Reize über unterschiedliche Rezeptoren wahrgenommen werden und zu andersartigen Reizantworten führen, bedienen sie sich oft gleicher Prinzipien zur Vermittlung von Signalen. G-Proteine, Calcium bzw. Calmodulin, Proteinkinasen und Proteinphosphatasen sind Elemente von Signaltransduktionsketten, die in Pflanzen und Tieren vorkommen. Der generelle Mechanismus der Signalvermittlung ist in vielen Fällen konserviert.

Eine große Familie konservierter Proteine, über deren Funktionen bei der Signalvermittlung noch wenig bekannt ist, sind die Immunophiline (Schreiber., 1991, Science 251: 283-287). Die Immunophiline stellen eine Superfamilie dar, deren Mitglieder in Bakterien, Hefen, Pflanzen und Tieren zu finden sind. Sie sind in verschiedenen Zellkompartimenten lokalisiert und an den verschiedenartigsten Prozessen zur Signalvermittlung beteiligt. Sie wurden als intrazelluläre Rezeptoren für immunsuppressive Substanzen in Säugetierzellen identifiziert (Hanschumacher et al., 1984, Science 266: 544-547). Die Immunophiline lassen sich strukturell und durch ihre Bindung zu Immunsuppressiva in drei Klassen unterteilen: Cyclophiline, die CyclosporinA binden, FK506 bindende Proteine, die FK506 oder Rapamycin binden und Parvuline, die keine Affinität gegenüber immunsupprimierender Substanzen besitzen. CyclosporinA, FK506 und Rapamycin sind Substanzen, die von bodenbewohnenden Pilzen synthetisiert werden. Ihre Wirkung in Säugetieren ist die Unterdrückung der Immunantwort, was in der Transplantationsmedizin genutzt wird, um die Abstoßungsreaktion gegen ein körperfremdes Organ zu mindern. CyclosporinA und FK506 inhibieren, wenn sie an ihre Rezeptoren gebunden sind, die Phosphataseaktivität von Calcineurin, was letztlich zu einer reduzierten T-Zellaktivierung führt (Cardenas et al., 1994, EMBO J. 13: 5944-5957; Kay et al., 1983, Immunology 50: 441-446). Obwohl Proteine der drei Immunophilinklasse weder große Sequenzhomologien noch dreidimensionale Strukturähnlichkeit besitzen, katalysieren sie alle die gleiche enzymatische Reaktion, nämlich die cis-trans Isomerisierung von

Prolylpeptidylbindungen (PPIase-Aktivität). Diese PPIase Enzymaktivität der Immunophilinen ist *in vitro* nachweisbar und durch Immunsuppressiva hemmbar (Fischer et al., 1989, *Nature* 337: 476-478). Ungeklärt ist inwieweit die PPIase-Aktivität *in vivo* für die Funktion von Immunophilinen von Bedeutung ist. Eine Chaperonaktivität konnte den PPIasen ebenfalls nachgewiesen werden, sie zeichnen sich jedoch gegenüber den klassischen Chaperonen wie Hsp70 und GroEL durch Substratspezifität aus (Freskgard et al., 1992, *Science* 258: 466-468). Die FK506-bindenden Proteine (FKBPs) werden ihrer Größe entsprechend eingeteilt. Es wurden FKBPs identifiziert, die nur eine PPIase-ähnliche Domäne besitzen oder aber auch Mitglieder mit mehreren PPIase-ähnlichen Domänen (siehe auch Abb. 10) (Kay, 1996). Mehrere PPIase-ähnliche Domänen in einem Protein könnten durch Duplikationen einer PPIase-Domäne entstanden sein (Callebaut et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6270-6274). Unter dem veränderten Selektionsdruck der sekundären PPIase-Domänen könnten Mutationen zur Entwicklung neuer Funktionen in diesen Domänen geführt haben. Das kleinste FKBP in Eukaryonten, FKBP12, ist ein relativ gut untersuchtes Immunophilin. Es vermittelt in Abhängigkeit von der gebundenen immunsupprimierenden Substanz unterschiedliche Antworten (Bram et al., 1993, *Mol. Cell. Biol.* 13: 4760-4769; Brown et al., 1994, *Nature* 369: 756-758; Liu et al., 1991, *Cell* 66: 807-815). Die Bindung von FK506 an FKBP12 führt zur Komplexbildung mit der Calcium/Calmodulin abhängigen Proteinphosphatase Calcineurin. Calcineurin ist an zahlreichen Signaltransduktionen beteiligt und seine Inhibierung durch den FKBP12-FK506-Komplex vermittelt u.a. die Unterdrückung der T-Zellaktivierung. Ein Substrat für die Dephosphorylierung durch Calcineurin ist der Transkriptionsfaktor NF-AT aktivierter T-Zellen. NF-AT kann nur dephosphoryliert in den Kern gelangen und dort die Transkription zahlreicher Gene stimulieren, die für die T-Zellproliferation nötig sind. Die Unterdrückung der Immunantwort durch FK506 wird anders als von Rapamycin über die Inaktivierung von Calcineurin vermittelt (Schreiber and Crabtree, 1992, *Immunology Today* 13: 136-142). Im Komplex mit Rapamycin interagiert FKBP12 mit dem Protein mTOR (mammalian target of rapamycin). Eine Domäne des Proteins mTOR besitzt Sequenzhomologie zur katalytischen Domäne von Phosphatidylinositol-Kinasen (Sabatini et al., 1994, *Cell* 78: 35-43). Die Antwort, die FKBP12 mit Rapamycin vermittelt führt in Interleukin-2 stimulierten T-Zellen zur Arrestierung in der G1-Phase des Zellzyklus. In Abwesenheit von immunsupprimierenden Substanzen interagiert FKBP12 mit Elementen anderer Signaltransduktionen, z.B. mit dem Rezeptor für den Transforming Growth Factor- β (TGF- β Rezeptor) und moduliert seine Funktion bei der Zellzykluskontrolle (Wang et al., 1994, *Science* 265: 674-676). FKBP12 ist desweiteren an der Regulation zweier intrazellulärer Calciumkanäle beteiligt, nämlich des Inositol-1,4,5-triphosphatrezeptors und des Ryanodinrezeptors (Brillantes et al., 1994; Cameron et al., 1995, *Cell* 83: 463-472). FK506 oder Rapamycin führte zur Dissoziation von FKBP12 und Calcineurin von den Calciumkanalkomplexen und darüber zu einem erhöhten Calcium-Efflux durch diese Kanäle. Die Regulation der Calciumkanäle durch FKBP12 konnte anhand von Untersuchungen einer transgenen Mausmutante, die kein funktionelles FKBP12 exprimiert, bestätigt werden (Shou et al., 1998, *Nature* 391: 489-492). FKBP12-defiziente Mäuse starben vor oder kurz nach der Geburt an einer Herzmuskelschwäche, die auch bei Patienten beobachtet wurde, die mit FK506 behandelt wurden. Die Calcium-Leitfähigkeit der Ryanodinrezeptoren in Skelettmuskeln dieser Mäuse glich der eines gereinigten Rezeptors ohne gebundenes FKBP12. FKBP59 aus Säugetieren wurde als essentielle Komponente von nicht an Liganden gebundene Steroidrezeptorkomplexe identifiziert (Sanchez et al., 1990, *Biochemistry* 29: 5145-5152). In diesem Multiproteinkomplex sind ebenfalls zwei Hitzeschock-Proteine, Hsp70 und Hsp90 identifiziert worden. Die Bindung von FKBP59 an den Steroidrezeptor erfolgt indirekt über Hsp90 (Peattie et al., 1992). Die Interaktion von FKBP59 und Hsp90 wird von einem konservierten Protein-Protein-Interaktionsmotiv, den sogenannten Tetratricopeptid Wiederholungen (TPR) vermittelt. Das TPR-Motiv ist eine 34-Aminosäuresequenz, die ursprünglich in Proteinen gefunden wurde, die bei der Zellzyklusregulation, der Transkriptionsregulation, dem Proteintransport und an der Hitzeschockantwort beteiligt sind (Goebel and Yanagida, 1991, *TIBS* 16: 173-177). Die TPR-Domäne des Typs III besteht aus der dreimaligen Wiederholung des TPR-Motivs, wobei zwei der Wiederholungen direkt aufeinanderfolgen. Der Abstand zum ersten TPR-Motiv ist konserviert und beträgt 10-16 Aminosäuren. Die Sequenzmotive bilden amphipatische α -Helices, die als „knob-hole“ Struktur bezeichnet wurden und eine spezifische Protein-Protein-Interaktion vermitteln können. Die Bindung eines Steroidhormons an den Rezeptorkomplex

führt zur Dissoziation von FKBP59 und Hsp90. Der ligandengebundene Steroidrezeptor kann nun in den Kern gelangen und ist an DNA gebunden am Aufbau eines Transkriptionskomplexes beteiligt. Es wird diskutiert, daß FKBP59 und die Hsp-Proteine zur Erhaltung der Konformation des nicht Liganden-gebundenen Steroidrezeptors benötigt werden (Pratt and Welsh, 1994, Sem. Cell Biol. 5: 83-93).

Vor wenigen Jahren wurden Immunophiline aus Pflanzenextrakten von *Vicia faba* über ihre Affinität zu FK506 und CyclosporinA isoliert (Luan et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 984-988). Dabei wurde auch ein FKBP12 isoliert, das hohe Sequenzhomologie zu FKBP12 aus Hefen und Tieren zeigt (zwischen 47%-51% Aminosäuresequenzidentität). In vitro zeigte dieses FKBP12 aus *Vicia faba* jedoch nur geringe Affinität zu Calzineurin, und in Hefen exprimiert vermittelte es nicht die Wirkung von FK506 und Rapamycin (Xu et al., 1998, Plant J. 15: 511-519). In *Vicia faba* konnte injiziertes FK506 eine Calcium-abhängige Regulation von Kaliumkanälen in Schließzellen nur dann inhibieren, wenn humanes FKBP12 ebenfalls exogen verabreicht wurde (Luan et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2202-2206), was ein Hinweis auf das Vorhandensein einer FKBP12-FK506 Signaltransduktionskette in Pflanzenzellen ist, ohne daß ein endogener Rezeptor für FK506 vorliegt.

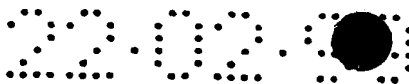
Aus einer Population von *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen, die durch T-DNA Insertion mutagenisiert wurden, ist eine Mutante isoliert worden, die sich durch drastische Veränderung ihres Phänotyps auszeichnet. Die twisted dwarf-Mutante besitzt einen pleiotropen Phänotyp, dessen Ausprägung sich in der Pflanzenarchitektur und der Physiologie manifestiert. Die twisted dwarf-Mutante ist in ihrer Gesamtgröße stark reduziert, zum Zeitpunkt der Seneszenz erreicht sie nur ein Drittel der Wildtyp-Gesamtgröße (ca. 25 cm). Die Mutante ist wie auch andere *Arabidopsis* dwarf-Mutanten dunkler grün und wirkt aufgrund der verkürzten Infloreszenzen kompakt. Das Wachstum der Rosettenblätter zeichnet sich durch extrem epinastische Krümmung und eine unregelmäßige Oberfläche aus. An ausgebreiteten Rosettenblätter ist zu erkennen, daß das Verhältnis von Blattlänge zur Blattspreite kleiner ist als bei Wildtyp-Rosettenblättern. Die stark verkürzte Sprossachse der Infloreszenz besitzt einen größeren Durchmesser als Wildtyp-Pflanzen. Das desorientierte Wachstum der Sprossachse gibt der Mutante ein für *Arabidopsis thaliana* ungewöhnliches Aussehen, das an eine Rankenpflanze erinnert. Das desorientierte Wachstum der Pflanzenorgane ist auch in den Staubblättern und im Fruchtknoten zu beobachten. Dieses desorientierte Wachstum sollte sich in einer Veränderung der Struktur von Zellwänden und intrazellulären Stütz- und Formelementen (z. B. Cytoskelett) manifestieren. Solche Veränderungen könnten für die Herstellung von Pflanzen verwendet werden, die zur Produktion von Faserstoffen und anderen Materialien verwendet werden, die neue, veränderte Materialeigenschaften haben. Die Schote ist, wie die Blüte, in ihrer Gesamtlänge geringer reduziert als die übrigen Organe, der Blütenstil ist jedoch stark verkürzt. Die Samen der twisted dwarf-Mutante zeigen auffälligerweise nicht die starke Größenreduzierung der anderen Pflanzenorgane. Im Vergleich zu Wildtypsamensamen ist bei Samen von twisted dwarf Mutanten sogar ein größeres Volumen festzustellen. Unabhängig von der unterschiedlich ausgeprägten Größenreduktion einzelner Pflanzenorgane ist das unregelmäßige und desorientierte Wachstum in allen Pflanzenorganeneinschließlich der Wurzel beobachtet worden. Die twisted dwarf-Mutation führt neben Veränderungen des Wachstums auch zu einer verlangsamten Entwicklung der Pflanze. Dies zeigt sich in einem verlängertem Lebenszyklus der twisted dwarf-Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Nach etwa 6 Wochen unter Langtagbedingungen (Lichtphase mind. 16 Stunden) setzt die Seneszenz beim Wildtyp ein. Der Lebenszyklus der twisted dwarf Mutante ist unter Langtagbedingungen um etwa eine Woche verlängert, unter Kurztagbedingungen (Lichtphase maximal 9 Stunden) sind es ca. drei Wochen.

Die verminderte Gesamtgröße der twisted dwarf-Mutante ist durch eine Verkürzung der Zellen verursacht. Epidermiszellen von primären Infloreszenzen des Wildtyps und der twisted dwarf-Mutante, die mit einer Pinzette abgelöst und anschließend mit Safranin-Rot angefärbt wurden, zeigen eine Verkürzung der Zellen aus der twisted dwarf Mutante auf ca. 33% (eigene unveröffentlichte Beobachtung). Sprühversuche von auf Erde wachsenden twisted dwarf Mutanten mit 10^{-7} M des Brassinosteroids Brassinolid zeigten ein verstärktes Streckungswachstum gegenüber Kontrolleexperimenten. Wurden jedoch Doppelmутanten von twisted dwarf und der Campesterol-Reduktase Det2, die eine Zwergmutante von *Arabidopsis*



thaliana darstellt, die durch exogene Applikation von Brassinosteroiden zum Wildtyp komplementiert werden kann, mit 10^{-7} M Brassinolid gesprüht, war bei diesen Pflanzen, die extremen Zwergwuchs aufweisen, keinerlei Reaktion auf die Brassinolidgaben festzustellen (eigene unveröffentlichte Beobachtung). Dieses Ergebnis läßt daher den Schluss zu, daß es sich bei der *twisted dwarf*-Mutante um eine Pflanze handelt, die an der Rezeption oder der Signalweiterleitung der Brassinosteroidantwort in Pflanzen beteiligt ist. Zum einen ließen sich durch Herstellung solcher Mutanten, Pflanzen mit reduzierten Wuchs als Zierpflanzen oder andere Nutzpflanzen gezielt herstellen; zum anderen könnten solche Pflanzen als Modelle zur Untersuchung der Steroidhormonwirkung verwendet werden.

Das desorientierte Wachstum der *twisted dwarf*-Mutante führte zu der Frage, ob die Mutante in der Lage ist ein gerichtetes, asymmetrisches Wachstum als Reaktion auf einen unidirektionalen Reiz (Tropismus) auszuführen. Die oberirdischen Pflanzenorgane reagierten wie der Wildtyp mit positivem Phototropismus und mit negativem Gravitropismus. Der Wurzelgravitropismus der Mutante *twisted dwarf* und des Wildtyps wurde anhand der Anzucht von Keimlingen auf vertikal positionierten Agarplatten verfolgt. Die vertikale Umorientierung der Platten nach 7 Tagen um 90° führte zu einer Änderung der Wachstumsrichtung deren Winkel nach weiteren 5 Tagen gemessen wurde. Ein Krümmungswinkel zwischen 80° - 100° wurde als gravitrop definiert (Yamamoto and Yamamoto, 1998, *Plant Cell Physiol.* 39: 660-664). Von Keimlingen der Mutante *twisted dwarf* zeigten nur 27% der Wurzeln ein gravitropes Wachstum. Die restlichen 73% zeigten ein agravitropes Wachstum. Die Wurzeln von Wildtyp-Keimlingen führten alle eine Änderung der Wachstumsrichtung um ca. 90° aus, was einem positiv-gravitropen Wachstum entspricht. Ein agravitropes Wurzelwachstum wurde auch in den Mutanten *eir1* (Luschnig et al., 1998, *Genes Dev.* 12: 2175-2187) und *aux1* (Maher and Martindale, 1980, *Biochem. Genet.* 18: 1041-1053) beobachtet. Diese Mutanten sind exogenen Applikationen von Ethylen gegenüber insensitive. Um die Ethylensensitivität der *twisted dwarf*-Mutante zu untersuchen, wurden Keimlinge unter den gleichen Bedingungen wie für die Kontrolle beschrieben inkubiert, nur wurden der Luft 10 ppm Ethylen zugesetzt. Zunächst wurde die *twisted dwarf*-Mutante auf ihren Phänotyp hin untersucht. Die erhöhte Ethylenkonzentration verursachte phänotypische Veränderungen zu denen eine Verkürzung der Wurzel, eine Zunahme des Hypokotylumfangs und eine Verkleinerung der Blattspreite gehören. Diese Veränderungen wurden im Wildtyp und in der *twisted dwarf*-Mutante gleichermaßen beobachtet. Auffällig war, daß die Wurzeln von *twisted dwarf*-Mutanten, die unter erhöhter Ethylenkonzentration gewachsen waren, alle ein gravitropes Wachstum zeigten, das dem des Wildtyps entsprach. Die erhöhte Ethylenkonzentration konnte jedoch keine weiteren Eigenschaften des *twisted dwarf*-Phänotyps revertieren. Die Messung der Krümmungswinkel zeigte, daß alle Wurzeln der *twisted dwarf*-Mutanten, die unter 10 ppm Ethylen angezogen worden waren, gravitrop wuchsen, jedoch nur 27% der unter Luft gewachsenen *twisted dwarf*-Wurzeln einen normalen Gravitropismus zeigten. Die Wurzeln von Wildtyp-Keimlingen wuchsen unter beiden Bedingungen gravitrop. Um zu überprüfen, ob der Wurzelgravitropismus der *twisted dwarf*-Mutante durch die Wirkung des Phytohormons Ethylen korrigiert wurde, wurde der Einfluß von Inhibitoren der Ethylenbiosynthese und von Inhibitoren der Ethylenwirkung auf den Wurzelgravitropismus von *twisted dwarf*- und Wildtyp-Keimlingen untersucht. Es wurde der gleiche Versuch wie oben beschrieben durchgeführt, allerdings mit dem Zusatz von Silbernitrat im *Arabidopsis*-Medium, einem Inhibitor der Ethylenwirkung. Eine Konzentration von $1 \mu\text{M}$ Silbernitrat im Wachstumsmedium und 10 ppm Ethylen in der Wachstumskammer führten bei den Wurzeln der *twisted dwarf*-Mutante verstärkt zu agravitropem Wachstum. Dieser Effekt wurde für Wildtyp-Pflanzen nicht festgestellt. Aminoethoxyvinylglycin (AVG), das die endogene Ethylenbiosynthese hemmt, führte in einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ dazu, daß nur 12% der Wurzeln von *twisted dwarf*-Mutanten gravitrop wuchsen. Bei diesem Versuch waren unter Kontrollbedingungen (Luft) 35% der Wurzeln von *twisted dwarf*-Mutanten gravitrop gewachsen. Unter Zusatz von $1 \mu\text{M}$ AVG zeigten jedoch auch 41% der Wurzeln von Wildtyp-Pflanzen ein agravitropes Wachstum. Ethylen könnte generell für den Wurzelgravitropismus von Bedeutung sein, da die Hemmung der endogenen Ethylensynthese auch bei Wildtypwurzeln zum agravitropen Verhalten führte. Mutanten von *twisted dwarf* in *Arabidopsis thaliana* und anderen Pflanzen könnten zur Herstellung von Pflanzen und Pflanzenorganen dienen, die eine verringerte Menge an Ethylen produzieren oder akkumulieren. Diesen Effekt ließe sich gezielt bei der Beeinflussung der



Frucht- und Samenreifung, sowie der Verlängerung und Kontrolle der Blühphase von Zier- und Nutzpflanzen einsetzen.

Der Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz des offenen Leserasters der twisted dwarf cDNA in den aktuellen Sequenzdatenbanken zeigt eine Sequenzidentität von 30-33% und eine Sequenzähnlichkeit von 43-53% zu FKBP's aus Menschen, Tieren und anderen Pflanzen. Das abgeleitete twisted dwarf Peptid weist bei den für eine FK506 Interaktion 14 identifizierten Aminosäurepositionen in vier Fällen identische und in weiteren vier Fällen konservierte Aminosäureaustausche auf. Im C-terminalen Bereich des Peptids ist eine dreifache Wiederholung eines TPR-Motivs zu finden. Für diese Motive ist in tierischen Systemen eine Interaktion mit Hsp90 mit FKBP's nachgewiesen worden (Callebaut et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6270-6274). Pflanzliche Mutanten dieser Klasse von Proteinen könnten sich als nicht tierische Modellsysteme für das Studium der Wirkung und Signalweiterleitung von Immunophilinen entwickeln lassen.

Die vorliegende Erfindung stellt nun DNA-Sequenzen zur Verfügung, die aus einem pflanzlichen Genom stammen und für ein FKBP ähnliches Protein kodieren, wobei die in der Nukleotidabfolge enthaltene Information bei Einführung und Expression in pflanzlichen Zellen zur Bildung einer Ribonukleinsäure führt und über diese Ribonukleinsäure ein FKBP ähnliches Protein in Zellen expremiert werden kann oder ein endogenes FKBP ähnliches Protein unterdrückt werden kann, was zur Veränderung der Pflanzenarchitektur führt, die Reaktion auf Brassinosteroide und deren Verbindungen unterdrückt, oder die durch Ethylen vermittelte Reaktion auf Gravitationsstimuli vermindert. Gegenstand der Erfindung sind insbesondere die DNA-Sequenzen aus *Arabidopsis thaliana* mit den nachfolgend angegebenen Nukleotidabfolgen sowie *Arabidopsis thaliana* -Mutanten, die in der angegebenen Nukleotidabfolge verändert sind.

22.02.99

SEQ ID NO.: 1
 Art der Sequenz: Nukleotid
 Sequenzlänge: 3999 Basenpaare

Strangform: Einzelstrang
 Topologie: linear
 Art des Molekils: genomische DNA

Herkunft
 Organismus: Arabidopsis thaliana, Ökotyp Wassilewskija
 Herkunft: genomische Bibliothek im Cosmid-Vektor pOCA 18Hyg
 Merkmale: Intron

Eigenschaften: FKBP ähnliches Protein-Gen twisted dwarf

```

1   GTCTAAGAACCTTAAGGAGAAAGAGATTAAGAGGCAGACATTGCTTGAGC
51  TTGTTGATTATGTTGCATCAGTTGGTTTAAAGTTTAAACGATGTTTCGATG
101 CAAGAGTTAAACGAAGATGGTAGCGGTTAATCTGTTTGAAGCTTTTCCTTC
151 TCGGAATCACGAGAGTAAATCTTGAATACATGATATGGATGATGAAG
201 AACCTTCTTTGGAGCCAGCTTGGCCTCATGTTCAAGTTGTGTATGAGATT
251 CTTCTCAGATTTCGTGGCTTCTCCCATGACTGATGCAAAGCTTGCCAAGAG
301 ATATATTGACCATTCTTTGTCTTGAAGCTCTTAGACTTGTGTTGATTCTG
351 AAGATCAAAGAGAGAGGGAATATCTAAAACTATTCTGCATCGGGTGTAC
401 GGGAAAGTTTCATGGTGCATCGACCTTACATCAGAAAGCGGATAAACAATAT
451 CTTCTACAGATTTCATATCCGAGACTGAAAAGCATAATGGCATTGCGGAGT
501 TGCTAGAGATTCTTGGAAAGTATAATTAATGGTTTTCGCTTTGCCTTTAAAA
551 GAAGAGCACAAGCTCTTCCTTTTGGGAGCCTTGATTCCTCTCCACAAGCC
601 TAAATGTTTCATCAGTCTATCACCACAGCTTTTCGTATTGCATTGTTCAAGT
651 TTGTAGAAAAGGACTTCAAGCTCGCTGATACCGTTATTAGAGGCTCTTTTA
701 AAATATTGGCCTGTGACTAACAGCTCAAAGGAAGTTATGTTTCTTTGGAGA
751 GTTAGAAGAAGTCTTGAAGCAACTCAAGCCGCTGAGTTTCAACGTTGTA
801 TGGTTCCATTATCCCGACAAATTGCTCGATGCCTCAACAGTTCACATTTTC
851 CAGGTTTCGAGTCTTTGACTATCATCACAACCTTCATATCTATCTCTTTGA
901 TAAAGTCTTGTACCTATATATGAAGTTGTACTTTTGTGTTGTGAGGTTGC
951 TGAAGAGCATTGTTTCTATGGAACAACGATCACATAAGAAACCTGATCA
1001 CTCAGAACCATAAAGTGATAATGCCTATAGTCTTCCAGCTCTTGAGAGA
1051 AACACGCGTGGACATTGGAACCAAGCAGTTCAAAGTCTGACTATAAACGT
1101 GAGGAAAGTATTATGCGAGATTGACCAAGTTCTTTTCGACGAGTGTTTAG
1151 CCAAATTCCAAGTAGAAGAAGTGAATAAAACAGAGGTTAAAGCGAAACGG
1201 GAAAGGACATGGCAACGGTTAGAAGATTAGCTACTTCAAAGACCGTTGT
1251 AACCAACGAGGCGTACTGGTTCCAAGATTGTGTCCTCAGTCAATCTTA
1301 CTACAAGCAGCTCTGAGTCCACAGGGTCGTAGTAGGCTCTCGTAGGTTAC
1351 TATGTACTTGTAAACAAATATTTGTGGTCACTATAGAAATGGTTCTTGAGA
1401 GACGACTGTATAATTATTTTAAATTTATAATCTTTTGGGTCAAATTGA
1451 GAATATTGATATTATTTTACTGAATTATAATAAACGCCGTTAAACTCT

                                Transkriptionsstart
1501 CGTTAGTTAAACGGCTGACTCTGAAGTGAAAACCTGAAAAGTCGAAGGGTCT
1551 CTTTATATTTTTCAGAAATCAAAATCTGAAATTTATCTCTCGGTCGATCCAG
1601 TCTTCGTGAGTGACTTCGACGACGACGACGAGTCACACTACTCTTGAGCT
1651 TCTCATACTTCGTAAGTTCACCTCTCTCTCTCTTAAATTGACAAACTTTT
1701 TCTTCGTTTTCTGCTATTATTGACGACGAGACTTGATTTTGTGTTTGAAT
  
```



1751 GAAATGGTTCAAGTAGCTGACTTCGACTATGTTCTTTGGGTTTTGTCA

1801 TTGAATCTTACTTGCTGATTGCTCGATGTTTAATCAATTCAACACTTA

1851 AAGATTCAATTTTTGGATTGACACTTGCACATTTTATTAGACCCAGGT

1901 TGATTTGGGAAATAATGGATGAATCTCTGAGCATCAAACCTCAAACACAT

1 M D E S L E H Q T Q T H 12

1951 GGTAAAGTAAATTTTCATAGATTTAATCTCTCTGAATACATATATGACT

2001 TCAATATGTTTGATTGGAGTTTTTTTGTGTCCCATATTCAATTGGATGC

2051 TTTGTTAAAGGATAAATGCTATCAAATTATGTTGACTGCGTTATTCTTT

2101 CTAAATCATATTGTGAATCTTGAACAAAGCATGTATACAACAAATTTGT

2151 TAGACTTAATAACTCCTTTTCTGTTTGTAAAGAATTGAGAATGACTATTG

2201 GGGTTGACTAATGCATCTTTTGTGGCTCCAGACCAAGAGAGCGAAATAGT

D Q E S E I V 19

2251 TACTGAAGGAAGTGCCGTTGTGCATAGTGAGCCATCTCAAGAGGGTAATG

T E G S A V V H S E P S Q E G N V 36

2301 TTCCTCCTAAAGTTGATAGTGAAGCTGAGGTCTTGGATGAGAAAGTCAGT

P P K V D S E A E V L D E K V S 52

2351 AAGCAGATTATAAAGGAAGGTCACGGTTCCAAACCATCCAAGTACTCTAC

K Q I I K E G H G S K P S K Y S T 69

2401 ATGCTTTTGTAAAGTACCCCTTTAGCTTCTGTTGATTGGATGTTGATTTTT

C F L 72

2451 CGATTGCACCTTGTGGCCTATTGCTACTGTTTATTGAATCTTCTATCT

2501 GACCAATTTTCATATTGGCCATAGTGCACTACAGGGCATGGACCAAAACT

H Y R A W T K N S 81

2551 CGCAGCACAAATTTGAGGATACATGGCATGAGCAGCAACCTATTGAATTG

Q H K F E D T W H E Q Q P I E L 97

2601 GTTCTTGGAAAAGGTATGTGGCTGTGCAATATGTACTCTACACCTCCATT

V L G K 101

2651 TCGTTAGATGAATCGTCATTGGTAAATTTGATGAGTTAGCTTGTGTATTA

2701 TATGAACCAATGAGATCGATATTTGGGAGGAAAAAAGATTGAGTTTGT

22.02.99

2751 ATTTTGTGCTCAATGCTGATTAGCCCATTTTAACGTCACATACAAT
2801 TTTTATTATAAAAAAGATTGTGCTACTAAGAGTGAAATGTTGTCTGTGAGA
2851 CAGAGAAAAAAGAACTAGCCGGTTTAGCCATCGGTGTTGCTAGCATGAAG
E K K E L A G L A I G V A S M K 117
2901 TCTGGTGAACGTGCGCTTGTGCATGTTGGCTGGCAATTAGCTTATGGGAA
S G E R A L V H V G W E L A Y G K 134
2951 AGAAGGAACTTTTCTTTTCCCAATGTTCCACCTATGGCAGACTTGTAT
E G N F S F P N V P P M A D L L Y 151
3001 ATGAGGTGGAAGTTATTGGGTTTGATGAACAAAGGAGGTAAGTTATTC
E V E V I G F D E T K E 163
3051 CTATACCATCATCTGTTTCTTACCAAGACGACTCCACATCCAAGCTT
3101 TATCCCAACCTCCTTGCTTACCTCTCTGACTTAGATGATGTATTGAACAG
3150 GGAAGGCTCGCAGTGATATGACTGTAGAGGAAGGATTGGTGCAGCAGA
G K A R S D M T V E E R I G A A D 180
3200 CAGAAGAAAAATGGATGGGAATTCTCTTTTAAAGGAGGAGAACTGGAGG
R R K M D G N S L F K E E K L E E 197
3250 AAGCCATGCAACAGTATGAAATGGTTATGCATCTCTCTCTATCTCTATCT
A M Q Q Y E M 204
3300 CTCTTTCCAACAATTACGGTCAAAGTTTAGGTTTTCAGGCATACTTAGTG
3350 AGTCTGCTCGAGGCTCTTGTGCTCTCTTTTGGCTTTTGATTAGTCATGGT
3400 TTTGCTGTTTCAGGCCATAGCATAACATGGGGGACGATTTTATGTTTCAGC
A I A Y M G D D F M F Q L 217
3450 TGTATGGGAAGTACCAGGATATGGCTTTAGCAGTTAAAAACCCATGCCAT
Y G K Y Q D M A L A V K N P C H 233
3500 CTTAACATAGCAGCTTGCCTCATCAAACTAAAAAGATACGATGAAGCAAT
L N I A A C L I K L K R Y D E A I 250
3550 TGGTCACTGCAACATTGTAAGACTCATCAAACCATTCATTTGAAGAAAAAT
G H C N I 255
3600 CATTAAAGTTCATACTCGGTTTCTCGAAATCTAATCAAACTCAAAACCTT
3650 ATCAGGTGTTGACAGAAGAAGAGAAAAACCCAAAAGCACTGTTTCAGAAGA



V L T E E E K N P K A L F R R 270
 3700 GGGAAAGCAAAGGCAGAGCTAGGACAGATGGACTCAGCACGTGATGATTT
 G K A K A E L G Q M D S A R D D F 287
 3750 CCGAAAGGCACAAAAGTATGCTCCTGACGACAAGGCGATTAGAAGAGAGC
 R K A Q K Y A P D D K A I R R E L 304
 3800 TACGAGCACTTGCAGAGCAAGAGAAAGCCTTGTACCAAAAGCAGAAAGAA
 R A L A E Q E K A L Y Q K Q K E 320
 3850 ATGTACAAAGCAATATTCAAAGGGAAAGATGAAGGTGGTGCTAAGTCAA
 M Y K G I F K G K D E G G A K S K 337
 3900 GAGCCTTTTTTTGGTTGATAGTGTATGGCAATGGTTTGTTCCTTTCT
 S L F W L I V L W Q W F V S L F S 354
 3950 CCCGTATCTTTTCGACGCCACAGAGTTAAAGCAGATTAATGTATGAAGAAG
 R I F R R H R V K A D Stop

Genomische Sequenz des twisted dwarf Gens einschließlich des Promoterbereichs. Das Start- und Stop-Codon sind unterstrichen dargestellt. Exonsequenzen sind durch Fettdruck gekennzeichnet, Intronsequenzen sind kursiv gedruckt. Am Zeilenbeginn der Nukleotidsequenz sind die durchnummerierten Positionen angegeben. In den Zeilen unter der Nukleotidsequenz ist jeweils die Aminosäuresequenz des offenen Leserasters angegeben. Aminosäurepositionen sind am Zeilenende nummeriert.

Zum besseren Verständnis der dieser Erfindung zugrundeliegenden Ausführungsbeispiele werden die wichtigsten eingesetzten Verfahren im folgenden erläutert.

1. Klonierungsverfahren

Zur Klonierung wurden der Phagenvektor Lambda ZipLox und das daraus abgeleitete Plasmid PZL-1 (Newman et al., 1994, Plant Phys. 106: 1241-1255) sowie das Phagemid pBluescript (pBS) (Short et al., 1988, Nucl. Acids Res. 16: 7583-7600) verwendet. Zur Expression in *E.coli* wurde der Expressionsvektor pET3-His (Novagen) verwendet.

Für die Transformation von Hefen wurden die Vektoren pAS1 und pACT2 (Clontech, Matchmaker 2-Hybrid System) und pRS314 (Sikorski und Hieter, 1989, Genetics 122: 19-27) verwendet.

Für die Pflanzentransformation wurden die Genkonstruktionen in pRT- Ω NotI (Überlackner and Werr, 1996, Mol. Breeding 2: 293-295) und den binären Vektor pGPTV-Bar (Becker et al., 1992, Plant Mol Biol. 20: 1195-1197) kloniert.

Bakterien- und Hefestämme

Für den pBluescript KS (pBS) Vektor, das Plasmid pZL-1 sowie für pAS1, pACT2 und pGPTV Konstrukte wurde der *E. coli* Stamm DH5a (Hanahan et al., 1983, J. Mol. Biol. 166:

557-580) verwendet. Die Expression des twisted dwarf Proteins erfolgte im E.coli-Stamm B121 (Studier und Moffat, 1986.).

Die Transformation der pGPTV-Konstrukte in Arabidopsis-Pflanzen wurde mit Hilfe des *Agrobacterium tumefaciens*-Stammes GV3101:pMP90 (Koncz und Schell, 1990, Mol. Gen. Genet. 204: 383-396)

Die Transformation von 2-Hybridkonstrukten erfolgte in den Hefestamm Y190.

3. Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Der Transfer der DNA in Agrobakterien erfolgte durch direkte Transformation mit nackter DNA nach Höfigen und Willmitzer (1988, Nucl. Acids Res. 16: 9877). Die Plasmid-DNA transformierter Agrobakterien wurde nach der Methode von Birnboim und Doly (1979, Nucl. Acids Res. 7: 1513-1523) isoliert und nach geeigneter Restriktionsspaltung gelelektrophoretisch auf Korrektheit und Orientierung der inserierten DNA überprüft.

4. Pflanzentransformation

Mit einer positiven Kolonie wurden 150 ml antibiotikahaltiges YEB-Medium angeimpft und 2 Tage bei 28°C geschüttelt. Mit 10-15 ml dieser Vorkultur wurden 500 ml antibiotikahaltiges YEB-Medium angeimpft. Diese Kultur wurde über Nacht bei 28°C auf dem Schüttler inkubiert und am nächsten Tag 15 min bei 4.000 rpm abzentrifugiert. Die sedimentierten Bakterien wurden in Infiltrationsmedium aufgenommen. Die Konzentration der Suspension wurde per Trübungsmessung bestimmt und auf eine OD₆₀₀ (optische Dichte) zwischen 0,8 und 1,2 eingestellt. In einen Vakuumexikator wurden 400 ml mit Agrobaktériensuspension gefüllte Plastik-Bechergläser gestellt. Töpfe mit Arabidopsis-Pflanzen wurden umgedreht auf die Bechergläser gestellt, so daß die Infloreszenzen der Pflanzen in die Agrobaktériensuspension hineintauchten. Es wurde ein Vakuum von 10-30 mbar für 15 min angelegt und anschließend der Vakuumexikator zügig belüftet. Eine Bakteriensuspension wurde für bis zu vier aufeinanderfolgende Infiltrationen verwendet. Danach wurden die Pflanzen weiter bis zum Abreifen der Schoten unter Langtagbedingungen (16 Stunden Licht/8 Stunden Dunkelheit) gehalten. Die 10 Pflanzen eines Topfes wurden in zwei Tüten (2 Pools) zu je 5 Pflanzen zum Sammeln der Samen eingetütet, wenn die ältesten Schoten der Pflanzen reif waren. Die gut getrockneten Samen konnten für eine Selektion mit BASTA® direkt auf Erde ausgesät werden. Die Aussaat erfolgte nach Pools getrennt in großen Schalen. Das erste Sprühen der Keimlinge mit BASTA®-Lösung erfolgte, wenn die Keimblätter voll entwickelt waren. Die Keimlinge wurden in den darauffolgenden 6 Tagen noch 1-2 mal mit BASTA® gesprüht. Nicht BASTA®-resistente Keimlinge blieben noch im Keimblattstadium aus und entwickelten sich nicht weiter. Die resistenten Keimlinge wurden bis zur Samenreife weiter wachsen gelassen und die Samen dieser Pflanzen einzeln abgeerntet.

Ausführungsbeispiel 1

Isolation des FKBP ähnlichen twisted dwarf Gens aus T-DNA getaggtten Insertionslinien von *Arabidopsis thaliana* mittels Plasmid-Rescue und Isolierung von Vollängen cDNA- und genomischen Klonen aus Genbibliotheken

Aus einer mittels T-DNA transformierten *Arabidopsis thaliana* Linie (Feldmann, 1991, Plant J. 1:71-82; Försthoefel et al., 1992, Aust. J. Plant Physiol. 19: 353-366) wurde über Plasmid-Rescue (Schulz et al., 1995, Plant Mol. Biol. Manual, pp 1-17) eine 200 bp lange die T-DNA Insertion flankierende DNA Sequenz des twisted dwarf Gens isoliert. Radioaktiv markierte Proben, die aus den bei der Plasmid-Rescue gewonnenen Plasmiden (Klon pBUB 52) hergestellt wurden, wurden zum Screenen der CD4-7 APRL-2 cDNA-Bibliothek (Newman et al., 1994, Plant Phys. 106: 1241-1255) und der CD4-11 genomischen Cosmid-Bibliothek (Schulz et al., 1995, Plant Mol. Biol. Manual, pp 1-17) eingesetzt. Ca. 200 000 Klone der

cDNA-Bibliothek wurden mit diesen Hybridisierungsproben gescreent. Aus einem positiv reagierenden λ -Klon wurde über *in vivo* Excision ein Plasmid isoliert und durch Bestimmung der DNA-Sequenz (Dideoxymethode: Sanger et al., 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467) analysiert. Aus dieser DNA-Sequenz wurde die Primärstruktur des twisted dwarf Proteins abgeleitet (Klon pBUB 65). Die cDNA wurde anschließend benutzt, um einen genomischen Klon aus der Cosmid-Bibliothek zu isolieren.

Ausführungsbeispiel 2

Expression von twisted dwarf Peptiden in *E. coli*, Reinigung der Proteine und Gewinnung von Antisera gegen das Protein in Kaninchen

Partielle cDNA-Sequenzen, die für die Aminosäurepositionen 1-324 und 1-187 kodieren wurden über PCR amplifiziert und nach Spaltung mit BamHI und XhoII in das Leseraster der His-Tag-Sequenz des mit BamHI linearisierten Vektors pET3 ligiert. Kompetente B121-Zellen wurden mit den Ligationen transformiert und die Expression der Peptide nach Induktion mit IPTG in Rohextrakten auf Laemmli-Gelen nachgewiesen. Die Fusionspeptide mit dem His-Tag wurden über Ni-NTA-Agarose (Novagen) gereinigt. Die apparenten Molekulargewichte wurden nach Vergleich mit Größenmarkern als 33kDa für das Peptid, das den Bereich von Position 1-187 umspannt und als 44kDa für das Peptid des Bereichs von Position 1-324 bestimmt. Zur Immunisierung von Kaninchen wurden das aufgereinigte Peptid (Pos. 1-187) über ein präparatives SDS-PAGE-Gel gereinigt. Die Proteinbande wurde durch Färbung des Gels mit Cu^{2+} -Ionen identifiziert, ausgeschnitten und zermörsert. Das zerkleinerte Gel wurde in Puffer aufgenommen und zur Immunisierung von Kaninchen von der Firma BioGenex (Berlin) eingesetzt. Nach der ersten Immunisierung erfolgten zwei weitere Booster-Immunisierungen, bevor Antisera gegen das twisted dwarf Protein durch Blutungen der Tiere gewonnen wurden. Die Erkennung des twisted dwarf Proteins durch das Antiserum wurde in Immunoblot-Experimenten getestet.

Ausführungsbeispiel 3

Transformation von mutierten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen mit einer Konstruktion zur Überexpression der Kodierregion des twisted dwarf Proteins

Zur Komplementation von twisted dwarf-Mutanten (twisted dwarf1-1, twisted dwarf1-3, twisted dwarf1-4) wurde das offene Leseraster des twisted dwarf-Gens anhand von PCR aus dem Plasmid BUB65 amplifiziert und nach BamHI/BglII Spaltung in die BamHI-Schnittstelle des Vektors pRT- Ω NotI kloniert. Der pRT- Ω NotI besitzt vor der BamHI-Restriktionssequenz einen CaMV 35S Promotor sowie eine Ω -Sequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus, welche die Translation von verschiedenen Reportergenen in Pflanzen 2-10fach erhöhen kann (Gallie et al., 1989, Plant Cell 1: 301-311). Ein Polyadenylierungssignal aus dem Blumenkohlmosaikvirus befand sich hinter der BamHI-Restriktionssequenz. Die Sequenzierung des Inserts zeigte, daß die klonierte twisted dwarf-cDNA-Sequenz keine Sequenzveränderungen aufwies. Die Kassette wurde mit dem Restriktionsenzym AscI aus dem pRT- Ω NotI herausgespalten und nach Auffüllen der überhängenden Enden durch Klenow-Polymerase in die ebenfalls aufgefüllte HindIII-Restriktionsstelle des binären Pflanzenvektors pGPTV-BAR ligiert. Das uidA-Leseraster war zuvor aus dem pGPTV-BAR durch eine SmaI/EcoRI Spaltung deletiert worden. Die Transformation von twisted dwarf-Mutanten anhand einer Vakuuminfiltration von Blüten erfolgte mit den binären Vektoren unter Verwendung des Agrobakterienstamms GV3101 pMP90. Transgene *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen wurden wie beschrieben auf Herbizidresistenz selektioniert und phänotypisch analysiert. Das Vorhandensein und die Struktur der transformierten Konstrukte in den transgenen Pflanzen wurde über DNA-Gelblot Analyse festgestellt. Alle mit der Gensequenz des intakten twisted dwarf Gens transformierten Mutantpflanzen zeigten eine Reversion des Phänotyps zum Wildtyp.

Ausführungsbeispiel 4

Sequenzanalyse verschiedener mutierter twisted dwarf Allele in Arabidopsis thaliana Mutanten

Weitere Arabidopsis thaliana-Mutanten, die den Phänotyp des twisted dwarf-Mutante aufwiesen wurden aus verschiedenen mutagenisierten Populationen isoliert. Über eine Kreuzungsanalyse mit der durch T-DNA-Insertion generierten Mutante konnte gezeigt werden, daß die verschiedenen mutierten Allele des gleichen Gens darstellen. Über ein DNA Gelblot-Experiment konnte für zwei der Mutanten ein Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP) gezeigt werden.

Zur genaueren Analyse der twisted dwarf-Mutanten wurden PCR-Produkte der mutierten Allele des Gens sequenziert und mit der Wildtyp-Sequenz verglichen. Die T-DNA Insertion im twisted dwarf-Allel 1-1 liegt im fünften Exon an Position +1484. Eine Deletion von 593 Bp von Position -122 bis +471 führte in der Mutante twisted dwarf1-3 zum Verlust eines Teils des Promotors, des Transkriptionsstarts sowie der ersten 35 Bp des offenen Leserasters. Die Verkürzung eines EcoRI-Fragments von etwa 600 Bp war schon in einem DNA Gelblot-Experiment beobachtet worden. Eine Nukleotidinsertion im dritten Exon an Position +823 und ein Nukleotidaustausch von Adenin zu Guanin an der Position +829 sind in der Mutante twisted dwarf1-4 identifiziert worden. Der Nukleotideinschub verursacht eine Leserasterverschiebung und führt dadurch zu einem Translationsstop nach 85 Aminosäuren. Es ist bei allen twisted dwarf-Allelen davon auszugehen, daß es sich um sogenannte Nullallele handelt, die kein funktionelles Genprodukt mehr hervorbringen können. Alle untersuchten twisted dwarf-Mutanten zeigen die gleiche Ausprägung des oben beschriebenen twisted dwarf-Phänotyps.

Patentansprüche

1. DNA Sequenzen, die die Kodierregion eines FKBP ähnlichen Proteins aus Arabidopsis thaliana enthalten, durch gekennzeichnet, daß diese DNA-Sequenzen die folgende Nukleotidabfolge aufweisen (Seq-ID No.: 1):

```

1   GTCTAAGAACCTTAAGGAGAAAGAGATTAAGAGGCAGACATTGCTTGAGC
51  TTGTTGATTATGTTGCATCAGTTGGTTTAAAGTTTAACGATGTTTCGATG
101 CAAGAGTTAACGAAGATGGTAGCGGTTAATCTGTTTAGAACTTTTCCTTC
151 TGCGAATCACGAGAGTAAATTCCTTGAAATACATGATATGGATGATGAAG
201 AACCTTCTTTTGAGCCAGCTTGGCCTCATGTCAAGTTGTGTATGAGATT
251 CTTCTCAGATTCGTGGCTTCTCCCATGACTGATGCAAAGCTTGCCAAGAG
301 ATATATTGACCATCTTTTGTCTTGAAGCTCTTAGACTTGTGTTGATTCGTG
351 AAGATCAAGAGAGAGGGAATATCTAATAAATCTTCTGCATCGGGTGTAC
401 GGAAGTTTCAATGGTGCATCGACCTTACATCAGAAAGGCGATAAACAATAT
451 CTTCTACAGATTCATATCCGAGACTGAAAAGCATAATGGCATTGCGGAGT
501 TGCTAGAGATTCTTGAAGTATAATTAATGGTTTTGCTTTGCCTTTAAAA
551 GAAGAGCACAAAGCTCTTCCTTTTGCAGGCTTGATTCTCTCCACAAGCC
601 TAAATGTTTCATCAGTCTATCACCACAGCTTTCGTATTGCATTGTTTCAGT
651 TTGTAGAAAAGGACTTCAAGCTCGCTGATACCGTTATTAGAGGTCTTTTA
701 AAATATTGGCCTGTGACTAACAGCTCAAAGGAAGTTATGTTTCTTGAGAG
751 GTTAGAAGAAGTCTTGAAGCAACTCAAGCCGCTGAGTTTCAACGTTGTA
801 TGGTTCCATTATCCCGACAAATTGCTCGATGCCTCAACAGTTCACATTTC
851 CAGGTTCCAGTCTTTGACTATCATCACAACCTTCATATCTATCTCTTGA
901 TAAAGTCTTGTACCTATATATGAAGTTGTACTTTTGTGTTGTCAGGTTGC
951 TGAAAGAGCATTTGTTCTATGGAACAACGATCACATAAGAAACCTGATCA
1001 CTCAGAACCATAAAGTGATAATGCCTATAGTCTTCCAGCTCTTGAGAGA
1051 AACACGCGTGGACATTGGAACCAAGCAGTTCAAAGTCTGACTATAAACGT
1101 GAGGAAAGTATTATGCGAGATTGACCAAGTTCTTTTCGACGAGTGTTTAG
1151 CCAAATCCAAGTAGAAGAAGTGAATAAACAGAGGTTAAAGCGAAACGG
1201 GAAAGGACATGGCAACGGTTAGAAGATTAGCTACTTCAAAGACCGTTGT
1251 AACCAACGAGGCACTACTCGTTCCAAGATTTGTGTCCTCAGTCAATCTTA
1301 CTACAAGCAGCTCTGAGTCCACAGGGTCGTAGTAGGCTCTCGTAGGTTAC
1351 TATGTACTTGTAAACAATATTTGTGGTCACTATAGAAATGGTTCTTGAGA
  
```



1401 GACGACTGTATAATTATTTTTTTTAAATTATAATCTTTTGGGTCAAATTGA
1451 GAATATTTGATATTATTTTACTGAATTATAATAACGCCGTTAAACTCT

1501 CGTTAGTTAACGGCTGACTCTGAAGTGAAACTGAAAAGTCGAAGGGTCT
1551 CTTTATATTTTCAGAATCAAATCTGAAATTTATCTCTCGGTGATCCAG
1601 TCTTCGTGAGTGACTTCGACGACGACGACGAGTCACACTACTCTTGAGCT
1651 TCTCATACTTCGTAAGTTCACCTCTCTCTCTCTAAATTGACAAACTTTT
1701 TCTTCGTTTTCTGCTATTATTGACGACGAGACTTGATTTGTTTTGAAAT
1751 GAAATGGTTCAAGTAGCTGACTTCGACTATGTTCTTTTGGGTTTTGTCA
1801 TTGAATCTTACTTGTCTGATTTGGTCGATGTTTAATCAATCAACACTTA
1851 AAGATTC AATTTTTGGATTGACACTTGCACATTTTTATTTCAGACCCAGGT
1901 TGATTTGGGAAATAATGGATGAATCTCTGGAGCATCAAACCTCAAACACAT

1 M D E S L E H Q T Q T H 12

1951 GGTAAGTAAATTTTCATAGATTTAATCTCTCTGAATACATATATGACT
2001 TCAATATGTTTGATGGAGTTTTTTTTGTTGTCCTCATTTCAATTGGATGC
2051 TTTGTTAAAGGATAAATGTCTATCAAATTATGTTGACTGCGTTATTCTTT
2101 CTAAATCATATTGTGAATCTTGAACAAAGCATGTATACAACAAATTTGT
2151 TAGACTTAATAACTCCTTTTCTGTTTGTAAAGAATTGAGAATGACTATTG
2201 GGGTTGACTAATGCATCTTTTGTGGCTCCAGACCAAGAGAGCGAAATAGT

D Q E S E I V 19

2251 TACTGAAGGAAGTGCCGTTGTGCATAGTGAGCCATCTCAAGAGGGTAATG

T E G S A V V H S E P S Q E G N V 36

2301 TTCCTCCTAAAGTTGATAGTGAAGCTGAGGTCTTGATGAGAAAGTCAGT

P P K V D S B A E V L D E K V S 52

2351 AAGCAGATTATAAAGGAAGGTCACGGTTCCAAACCATCCAAGTACTCTAC

K Q I I K E G H G S K P S K Y S T 69

2401 ATGCTTTTGTAAAGTACCCTTTAGCTTTCTGTTGATTGGATGTTGATTTT

C F L 72

2451 CGATTGCACTTGTGGCCTATTGCTACTGTTTATTGAATCTTTCTATCT

2501 GACCAATTTTCATATTGGCCATAGTGCACTACAGGGCATGGACCAAAAAC

H Y R A W T K N S 81

22.02.99

2551 CGCAGCACAAATTTGAGGATACATGGCATGAGCAGCAACCTATTGAATTG
Q H K F E D T W H E Q Q P I E L 97

2601 GTTCTTGGAAGGATATGTGGCTGTGGAATATGTACTCTACACCTCCATT
V L G K 101

2651 TCGTTAGATGAATCGTCATTGGTAAATTTGATGAGTTAGCTTGTGTATTA

2701 TATGAACCCAATGAGATGGATATTTGGGAGGAAAAAGATTGAGTTTGT

2751 ATTTTTTTTGTCTCAATGCTGATTAGCCATTTTAACGTCCTATACAAT

2801 TTTTTTTTATAAAAAAGATTGTGCACTAAGAGTGAAATGTTGTCTGTGAGA

2851 CAGAGAAAAAGAACTAGCCGGTTTAGCCATCGGTGTTGCTAGCATGAAG
E K K E L A G L A I G V A S M K 117

2901 TCTGGTGAACGTGCGCTTGTGCATGTTGGCTGGGAATTAGCTTATGGGAA
S G E R A L V H V G W E L A Y G K 134

2951 AGAAGGAAACTTTTCTTTTCCCAATGTTCCACCTATGGCAGACTTGTTAT
E G N F S F P N V P P M A D L L Y 151

3001 ATGAGGTGGAAGTTATTGGGTTTGATGAAACAAAGGAGGTAAGTTATTC
E V E V I G F D E T K E 163

3051 CTATACCATCATCTTGTTCCTTACCAAGAGGACTCCACATCCAAGCTT

3101 TATCCCAACCTCCTTGCTTACCTCTCTGACTTAGATGATGTATTGAACAG

3150 GGAAAAGCTCGCAGTGATATGACTGTAGAGGAAAGGATTGGTGCAGCAGA
G K A R S D M T V E E R I G A A D 180

3200 CAGAAGAAAAATGGATGGGAATTCTCTTTTTTAAGGAGGAGAAACTGGAGG
R R K M D G N S L F K E E K L E E 197

3250 AAGCCATGCAACAGTATGAAATGGTTATGCATCTCTCTCTATCTCTATCT
A M Q Q Y E M 204

3300 CTCTTTCCAACAATTACGGTCAAAGTTTAGGTTTTAGGCATACTTAGTG

3350 AGTCTGCTCGAGGCTCTTGTGTCTTCTTTGGGCTTTTGATTAGTCATGGT

3400 TTTGCTGTTTCAGGCCATAGCATAACATGGGGGACGATTTTATGTTTCAGC
A I A Y M G D D F M F Q L 217

3450 TGTATGGGAAGTACCAGGATATGGCTTTAGCAGTTAAAAACCCATGCCAT

Y G K Y Q D M A L A V K N P C H 233
 3500 CTTAACATAGCAGCTTGCCTCATCAAACTAAAACGATACGATGAAGCAAT
 L N I A A C L I K L K R Y D E A I 250
 3550 TGGTCACTGCAACATTGTAAGACTCATCAAACCATTCATTTGAAGAAAAT
 G H C N I 255
 3600 CATTAAAGTTCATACTCGGTTTCTCGAAATCTAATCAAACCTCAAACCTT
 3650 ATCAGGTGTTGACAGAAGAAGAGAAAAACCCAAAAGCACTGTTGAGAAGA
 V L T E E E K N P K A L F R R 270
 3700 GGGAAAGCAAAGGCAGAGCTAGGACAGATGGACTCAGCACGTGATGATTT
 G K A K A E L G Q M D S A R D D F 287
 3750 CCGAAAGGCACAAAAGTATGCTCCTGACGACAAGGCGATTAGAAGAGAGC
 R K A Q K Y A P D D K A I R R E L 304
 3800 TACGAGCACTTGCAGAGCAAGAGAAAGCCTTGTACCAAAGCAGAAAGAA
 R A L A E Q E K A L Y Q K Q K E 320
 3850 ATGTACAAAGGAATATTCAAAGGGAAAGATGAAGGTGGTGTAGTCAAA
 M Y K G I F K G K D E G G A K S K 337
 3900 GAGCCTTTTTTTCGTTGATAGTGTATGGCAATGGTTTGTTCCTTTTCT
 S L F W L I V L W Q W F V S L F S 354
 3950 CCCGTATCTTTCGACGCCACAGAGTTAAAGCAGATTAATGTATGAAGAAG
 R I F R R H R V K A D

2. DNA Sequenzen, die mit der DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1, oder Teilen davon oder Derivaten, die durch Insertion, Deletion oder Substitution von diesen Sequenzen abgeleitet sind hybridisieren und für ein FKBP ähnliches Protein kodieren.
3. Plasmide enthaltend DNA-Sequenzen gemäß Anspruch 1 oder 2, oder Teilen davon oder Derivaten, die durch Insertion, Deletion oder Substitution von diesen Sequenzen abgeleitet sind.
4. Bakterien, enthaltend DNA-Sequenzen gemäß Anspruch 1 oder 2, oder Teilen davon oder Derivaten, die durch Insertion, Deletion oder Substitution von diesen Sequenzen abgeleitet sind.
5. Hefen, enthaltend DNA-Sequenzen gemäß Anspruch 1 oder 2, oder Teilen davon oder Derivaten, die durch Insertion, Deletion oder Substitution von diesen Sequenzen abgeleitet sind.
6. Pflanzenzellen, enthaltend DNA-Sequenzen gemäß Anspruch 1 oder 2, oder Teilen davon oder Derivaten, die durch Insertion, Deletion oder Substitution von diesen Sequenzen abgeleitet sind.
7. Transformierte Pflanzenzellen und aus diesen regenerierte transgene Pflanzen enthaltend DNA-Sequenzen gemäß Anspruch 1 oder 2, oder Teilen davon oder Derivaten, die durch

Insertion, Deletion oder Substitution von diesen Sequenzen abgeleitet sind, wobei diese Sequenz als Bestandteil eines rekombinanten DNA-Moleküls in die Pflanzenzellen eingeführt wurde.

8. Verwendung von DNA-Sequenzen gemäß Anspruch 1 oder 2, oder Teilen davon oder Derivaten, die durch Insertion, Deletion oder Substitution von diesen Sequenzen abgeleitet sind zur Einführung in pro-oder eukaryontische Zellen, wobei diese sequenzen gegebenenfalls mit steuerelementen, die die Transcription und Translation in den Zellen gewährleisten, verknüpft sind und zur Expression einer translatierbaren mRNA für ein FKBP ähnliches Protein führen.

9. Verwendung von DNA-Sequenzen gemäß Anspruch 1 oder 2, oder Teilen davon oder Derivaten, die durch Insertion, Deletion oder Substitution von diesen Sequenzen abgeleitet sind, zur homologen Rekombination oder zur Expression einer nicht translatierbaren RNA, die mittels „anti-sense“-Effekts, eine Kosuppression oder einer Ribozymaktivität die Synthese eines oder mehrerer endogener FKBP ähnlicher Gene in den Zellen verhindert.

10. Verwendung von DNA-Sequenzen gemäß Anspruch 1 oder 2, oder Teilen davon oder Derivaten, die durch Insertion, Deletion oder Substitution von diesen Sequenzen abgeleitet sind, zur Veränderung der Reaktion von Pflanzen auf Brassinosteroide und ihrer Vorstufen und Derivate und ihrer Signalweiterleitung und Rezeption.

11. Verwendung von DNA-Sequenzen gemäß Anspruch 1 oder 2, oder Teilen davon oder Derivaten, die durch Insertion, Deletion oder Substitution von diesen Sequenzen abgeleitet sind, zur Veränderung der Ethylen induzierten gravitropen Reaktionen von Pflanzenwurzeln oder der durch Ethylen vermittelten Signalweiterleitung gravitroper reize.

12. Verwendung von DNA-Sequenzen gemäß Anspruch 1 oder 2, oder Teilen davon oder Derivaten, die durch Insertion, Deletion oder Substitution von diesen Sequenzen abgeleitet sind, zur Veränderung des Streckungswachstums von Pflanzen und ihrer Wachstumsorientierung zur Veränderung der Pflanzenarchitektur.

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft DNA-Sequenzen aus *Arabidopsis thaliana*, die die Kodierregion eines FKBP-ähnlichen (FK506 bindendes Protein) Gens (twisted dwarf) enthält, deren Aktivität in einem pflanzlichen Genom die Veränderung der Gesamtarchitektur der Pflanze durch Verringerung des Zellwachstums, Desorientierung des Wachstums aller überirdischen wie unterirdischen Organe, Verringerung des Verzweigungsgrads des Sproßes, Veränderungen in der Reaktion auf Brassinosteroide und deren Vorstufen und Derivate und die Veränderung der Reaktion der Wurzel auf gravitrope Reize durch die Veränderung von Ethylenproduktion und Ethylen induzierte Signalweiterleitung zur Folge hat, Plasmide, Hefen und Bakterien enthaltend diese DNA-Sequenz, sowie Mutanten in *Arabidopsis thaliana*, in denen die twisted dwarf DNA-Sequenz entweder durch T-DNA Insertion oder durch Deletion oder Insertion verschieden großer DNA-Bereiche verändert wurde und die erwähnten Veränderungen aufweisen. Des weiteren betrifft die Erfindung transgene Pflanzen, bei denen mutierte DNA-Sequenzen der angegebenen Gensequenz durch Einführung intakter Genkopien phänotypisch zum Wildtyp restauriert wurden. Weiterhin betrifft die Erfindung die Nutzung der beschriebenen Gensequenz des twisted dwarf-Gens zur Identifizierung verwandter FKBP ähnlicher Gene aus anderen dikotylen und monokotylen Pflanzen durch Hybridisierung mit niedriger Stringenz oder durch PCR Techniken, sowie die Nutzung des twisted dwarf Gens und seiner Mutanten als pflanzliches Testsystem zum Studium von immunsuppressiven Substanzen (besonders FK506 (Tacrolimus), Rapamycin, CyclosporinA und weiterer Substanzen mit ähnlicher Wirkung), ihrer Wirkung, sowie Prozessen der Signalvermittlung der Wirkung von Immunsuppressiva.

